

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین



پایان نامه کارشناسی ارشد

گروه زیست فناوری پزشکی

عنوان

ارزیابی اثرات برخی پپتیدهای اتصال یابنده به رسپتور Trk B بر روی رده های سلولی Sk-ov-3 و ov-car-3

اساتید راهنما

جناب آقای دکتر نعمت الله غیبی

جناب آقای دکتر مرتضی کریمی پور

اساتید مشاور

آقای دکتر حمزه رحیمی

آقای مهندس جوادی

نگارنده

مرضیه کفشدوزی امین

تابستان ۹۲

Contents

۸	سرطان
۱۱	درمان سرطان
۱۳	گیرنده TrkB و عملکرد آن
۱۶	Trk B و سرطان
۱۸	ساختار Trk B
۲۰	سایتهای اتصال یابنده در رسپتور Trk
۲۰	فاکتورهای نورو ترفیک و عملکرد آنها
۲۳	پروتئین BDNF و عملکرد آن
۲۵	داروهای مهار کننده Trk B
۲۷	پپتید درمانی
۲۹	بیو انفورماتیک
۲۹	فلو سایتو متری
۳۰	Western Blot
۳۲	مواد و روشها
۳۳	طراحی کتابخانه پپتیدی

۳۴	ایجاد اسکلت های انعطاف پذیر پتیدی
۳۶	طبقه بندی پتیدهای تولید شده بر اساس انرژی
۳۶	انتخاب بهترین پتیدها بر اساس انرژی
۳۶	ایجاد ساختار سه بعدی پایدارترین پتید ها
۳۷	اتصال پتید های طراحی شده با گیرنده Trk B
۳۹	بررسی اینترکشن های پپتیدی و رسپتور
۴۰	بخش آزمایشگاهی
۴۰	محلونها
۴۱	کشت سلولی
۴۲	پاساژ سلولی (sub-culture)
۴۲	سلولهای چسبنده
۴۳	سلولهای سوسپانت
۴۴	فریز کردن
۴۴	طرز تهیه FBS دکملمان برای استفاده در کشت سلولی
۴۵	ذوب کردن
۴۵	شمارش سلولی

۴۶MTT Assay
۴۸غلظتهای استفاده شده برای پیتید
۴۹فلو سایتو متری
۵۰استخراج پروتئین
۵۱مواد مورد استفاده برای جمع آوری کردن (Harvest) سلول :
۵۴اندازه گیری پروتئین با روش برادفورد
۵۵مراحل وسترن بلاتینگ
۵۶آماده سازی ژل SDS-PAGE
۵۹آماده کردن پروتئین ها برای Loading در SDS-PAGE
۶۰مرحله ترانسفر
۶۲Preparation of solutions:
۶۳آماده کردن کاغذ pvdf
۶۳مرحله بلات کردن
۶۶طراحی کتابخانه پیتیدی
۷۰IC50% سلولها
۷۱پیشگویی ساختار سه بعدی
۷۲تداخل لیگاند - رسپتور

۷۶ آمینو اسیدهای شرکت کننده در اینترکشن
۷۹ نمایش اینترکشن های گیرنده Trk B با پپتید های طراحی شده :
۸۳ بررسی اثر توکسیک پپتیدهای سنتز شده با آزمون بقا سلول
۸۹ نتایج فلو سایتو متری
۹۷ نتایج وسترن بلات
۱۰۱ اینترکشن های پپتید ها و رسپتور

خلاصه فارسی

سرطان به عنوان دومین عامل مرگ ومیر بعد از بیماریهای قلبی ساخته شده است، یکی از مهمترین پروتئینهای انکوژن TRK

B می باشد که دارای لیگاند اختصاصی خود BDNF(Brain derived neutrophic factor) میباشد و بیان بیش از حد

این گیرنده در سرطانهای پروستات و مولتیپل مایلوما و تخمدان و تیروئید مشاهده شده است.

BDNF با اتصال خود به گیرنده TRK B باعث دایمراسیون در این گیرنده و ایجاد سیگنالهایی در جهت آنژیوژنسیس و

افزایش میزان تعداد سلولها می شود، هدف در این مطالعه طراحی پپتیدهایی بر علیه گیرنده TRK B (Tropomyocin

(Receptor B Kinase به عنوان مهار کننده می باشد، در این مطالعه ابتدا در قسمت Insilico کتابخانه پپتیدی با روش

sequence tolerance ساخته شد و بهینه سازی انرژی پپتید با پروتکل backrub انجام شد و پپتیدهایی با حداکثر

پایداری بر اساس backrub score توسط نرم افزار R انتخاب شدند و سپس ساختار سه بعدی پپتیدها با استفاده از روش

دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار Hyperchem 7 تعیین گردید و Docking این پپتیدها توسط نرم افزار

HADDOCK تکمیل گردید، نحوه اتصال آنها توسط نرم افزار Lighplot انجام گردید و ساختار سه بعدی این پپتیدها با

گیرنده توسط نرم افزار PYMOL انجام شد و در نهایت توالی ۲ عدد از بهترین پپتیدها با کمترین انرژی توسط شرکت Tag

copeghene دانمارک سنتز شدند .

در قسمت آزمایشگاهی، ابتدا با انجام تست MTT اثر توکسیک پپتید ۱ و پپتید ۲ در غلظتهای ۵۰، ۲۰۰، ۳۵۰، ۵۰۰ نانو مولار

و سیکلو تراکسین در غلظت ۲۰۰ نانو مولار به عنوان کنترل مثبت بر روی رده سلولی RPMI822, Sk-ov-3, Ov-car-3،

U266 مطالعه شد و سپس فلوسایتومتری برای سلولها با کیت FITC-Annexin V در غلظتهای ۴۵۰ و ۳۵۰ نانو مولار برای

پپتید ۱ و پپتید ۲ و در غلظت ۲۰۰ نانو مولار برای سیکلو تراکسین انجام گردید، سپس پروتئینها بعد از Treatment پروتکل

لیز بافر ، لیز شده و پروتئین های آنها استخراج گردیده و توسط دستگاه اسپکترومتری برادفورد غلظت آنها مشخص شد و سپس

Western blotting برای بررسی میزان بیان پروتئینها بعد از Treatment انجام شد.

یافته ها نشان داد که پپتیدهای طراحی شده دارای تمایل اتصال بالایی به رسپتور Trk B داشته و باعث مهار رشد سلولی در

رده سلولی ذکر شده دارند و نتایج این مطالعه نشان داد که مهار رسپتور Trk B می تواند به توقف رشد سلول سرطانی منجر

شود.